

学 位 論 文 要 旨

氏 名

吉野 苑美



論 文 題 目

「心血管疾患における血清 $\alpha 2$ -マクログロブリンの病態生理学的意義の検討」

指 導 教 授 承 認 印

七里 真義



(以下要旨本文)

【背景と目的】

糖尿病患者においては、細小血管障害や心血管疾患をはじめとした大血管障害などの合併症が患者の予後に大きく影響している。日常診療を行う上でも、多くの糖尿病患者にとって合併症予防は最重要課題であると考えられ、有用なバイオマーカーの探索や病態の解明が期待されている。アルブミン尿は心血管疾患の発症リスクであることが知られているが、そのメカニズムに関しては未だ明らかではない。 $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2M$)は、ヒト末梢循環中の高濃度タンパク質の中でも最大の非免疫グロブリン分子であり、主に肝臓で合成される。非特異的なプロテアーゼインヒビターであり、セリン、スレオニン、メタロプロテアーゼおよび炎症性サイトカインを阻害、発現を調整することで、細胞増殖や肥大、糖尿病の病態を反映するバイオマーカーとされ種々の疾患のバイオマーカーとして期待されている。しかしながら、 $\alpha 2M$ については測定法も一定でなく、結果も報告による隔たりが大きい。

最近では「 $\alpha 2M$ の心臓型アイソフォーム」と呼ばれる 182kDa のタンパクが心筋梗塞で上昇していること、実験動物モデルで心肥大を直接誘導することが示されているが、我々の研究室では最近、このタンパク質がアイソフォームではなく、 $\alpha 2M$ そのものであることを質量分析法にて解明した。またウエスタンブロッティングを用いた $\alpha 2M$ 単量体の半定量的測定法にて糖尿病細小血管合併症との関連について報告した。今回、高感度 ELISA 系による $\alpha 2M$ 測定系を確立することで、より詳細で簡便な $\alpha 2M$ の測定を行い、血中 $\alpha 2M$ の病態生理学的意義を解明することを目的とした。

【対象】

健常者 31 例、北里大学メディカルセンター病院と北里大学病院の内分泌代謝内科に入院もしくは通院する糖尿病患者 210 例、甲状腺疾患患者（バセドウ病、橋本病）41 例を対象とした。

【方法】

・試料収集

対象者の身長・体重・病歴・生活歴・服薬内容を聴取し、患者群では定期受診時や入院中に施行した採血データ（血糖, HbA1c, BUN, Creatinine, TSH, free T3, free T4, BNP, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, Triglyceride）と尿検査（尿中アルブミン/クレアチニン比）、心電図、マスターダブル負荷試験、Ankle Brachial Pressure Index (ABI) / 脈波伝播速度 (Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity: baPWV) 検査、頸動脈エコーと心エコー、心臓カテーテル検査や冠動脈 CT を解析データとして使用した。また 54 例で施行した持続血糖測定 (CGM) も解析データとして使用した。健常者群では、最新の健康診断時の血液、尿検査データを使用した。

・ELISA

本測定は3重測定で行った。希釈した $\alpha 2M$ 標準品と血清検体を96穴マイクロプレートに、4°Cで一晩静置した。洗浄後、5% skim milk にて室温で2時間ブロッキングを行った。続いて、Human $\alpha 2$ -macroglobulin antibody (Monoclonal Mouse IgG1 Clone, R&D systems) を希釈 (1:5000) し、4°Cで一晩静置した。Goat anti-mouse IgG (H+L) -HRP Conjugate (Bio-Rad) を希釈 (1:10000) し、遮光下にて室温で1時間静置した。O-phenylendiamine を、遮光下、室温で30分間反応させた後、3N HCl で反応停止した。反応停止後のプレートを490nmにて吸光度を測定した。

・ Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis(BN-PAGE)、Western Blotting

$\alpha 2$ -macroglobulin 標準品 0.1 μ g、血清 0.025 μ l を 25mM dithiothreitol (DTT; Nacalai Tesque) 添加の有無による違いについて検討した。各サンプルならびにタンパクマーカー (Native Mark™ unstained protein standards ; Thermo Fisher Scientific) は gradient 5-20 % gel (Perfet NT Gel; DRC, Osaka, Japan) に load し、CBB-G250 が添加された Buffer を Thermo Fisher Scientific の添付文書に従い作成し使い、150V で泳動した。

BN-PAGE 後のゲルを PVDF membrane に 75V 120 分間の条件で転写した。Membrane を固定後、MeOH に浸し、CBB G-250 色素を除去し、4°Cで一晩ブロッキングを行った。続いて、1次抗体として Human $\alpha 2$ -macroglobulin antibody (Monoclonal Mouse IgG1 Clone; R&D systems) を 1:5000 に希釈して、4°Cで一晩静置した。2次抗体には Goat anti-mouse IgG (H+L) -HRP Conjugate (Bio-Rad) を 1:10000 に希釈し、室温で1時間振盪した。化学発光法にてタンパク質バンドを検出し、解析を行った。

【結果】

抗ヒト $\alpha 2M$ IgG を用いた ELISA 測定系を確立し、これは単量体、二量体および四量体の $\alpha 2M$ を認識することを確認した。0~0.5 μ g/ml の四量体 $\alpha 2M$ 標準品を用いて標準曲線を作成し、血清の連続希釈を標準曲線に適用すると、 R^2 値 0.9646 として非常に良好な相関が得られた。血清サンプルの intra-assay CV は 2.3% (n=8) および inter-assay CV 13.8% (n=14) であった。糖尿病患者の血清サンプル 40 例を用いて、今回の ELISA で得られた結果と、以前に当研究室で作成したウエスタンブロッティングを用いた単量体 $\alpha 2M$ の半定量的測定値を比較した。ELISA の $\alpha 2M$ 値は、単量体 $\alpha 2M$ 値と密接な相関を示した ($R^2=0.575$, $p<0.0001$)。

健常者 31 人と糖尿病患者 210 人、バセドウ病患者 29 人、橋本病患者 12 人の血清 $\alpha 2M$ 濃度を測定した。糖尿病、バセドウ病、橋本病患者では、 $\alpha 2M$ 値は健常者 (254.5 ± 82.4 mg/dl) と比較して有意に高値であった (301.0 ± 111.0 mg/dl ; $p<0.05$, 347.4 ± 85.9 mg/dl ; $p<0.001$, 376.3 ± 70.1 mg/dl; $p<0.001$)。Pearson の単変量相関分析では、糖尿病患者において $\alpha 2M$ は、ACR ($p<0.0001$, $R^2=0.0516$)、baPWV ($p=0.0012$, $R^2=0.05617$)、LVPWth ($p=0.0172$, $R^2=0.044417$) および IVSth ($p=0.0361$, $R^2=0.044417$) と相関を示した。全体で $\alpha 2M$ 値は女性で有意に高値であるも、糖尿病群では差がなく、また年齢や HbA1c とは相関を認めなかった。 $\alpha 2M$ は、網膜症を有する群、マスターダブル負荷試験陽性群、冠動脈狭窄所見を有する群で、それぞれの有さない群よりも有意に高値であった。さらに、持続血糖測定(CGM)にて48時間連続血糖測定を行った54人(51人の糖尿病患者)の結果を分析した。平均血糖値、CV、SD、J-Index、M値などの血糖変動指数のいずれも、

$\alpha 2M$ との相関を示さなかった。全体の多変量解析では、ACR と baPWV のみが $\alpha 2M$ 値と独立して関連していることが明らかになった。

【考察】

本研究では血清中 $\alpha 2M$ に特異的な高感度 ELISA 系の開発に成功した。最小検出感度は 0.5 ng/ml と低く、測定間誤差、測定内誤差も小さく、安定した再現性を示した。これまでヒト血中 $\alpha 2M$ の定量に関しては、古くから数多くの報告がされてきたが、文献による濃度の違いは 6 桁におよぼほど隔たりがあった。測定系が確立している既知の他の数多くの蛋白濃度と照らし合わせると、今回の結果はきわめて妥当な値であることが明らかである。我々の確立した測定系はヒト血清中 $\alpha 2M$ の定量に適した初めての ELISA 測定系であると考えられた。

今回、ヒト血液中の $\alpha 2M$ の分子存在様式を明らかにするために、BN-PAGE を用いて血清中 $\alpha 2M$ を検出したところ、分子量は精製 $\alpha 2M$ の 4 量体と同一の 725kDa であった。還元剤 DTT 処理によりジスルフィド結合を切断すると、SDS の非存在下でも $\alpha 2M$ 標準品も血清中 $\alpha 2M$ のいずれも 182 kDa の単量体に分離した。血中 $\alpha 2M$ についてはこれまで単量体同士がジスルフィド結合して 2 量体となり、さらに 2 量体が非共有結合で 4 量体を形成している dimer の dimer と推測されてきたが、今回の結果では、血中には主に 4 量体で存在すること、DTT のみによる処理によって単量体になったことから、4 つの単量体がそれぞれジスルフィド結合で 4 量体を形成している可能性が示唆された。さらに、血中 $\alpha 2M$ レベルが増加している糖尿病および甲状腺疾患患者では 4 量体の他に 2 量体成分がみられたことから、 $\alpha 2M$ 合成が増加している疾患では血中に 2 量体も存在している可能性が考えられた。今回、我々が用いた $\alpha 2M$ 抗体はヒト血中に存在する 4 量体以外にも、合成された 2 量体や単量体が存在しても交叉活性を示して測定可能なことが明らかとなった。血清 $\alpha 2M$ を還元し単量体化したものを定量的ウエスタンブロッティングで半定量的に測定した検体を ELISA による計測値と比較したところ、両者は高い相関を示したことから、今回の ELISA 法が循環血中に存在する 2 量体と 4 量体の両者を認識するため、すべての $\alpha 2M$ 分子を単量体化させた総量を反映していることを示している。

$\alpha 2$ -macroglobulin 濃度の意義

triiodothyronine は TRE を介して $\alpha 2M$ を誘導することが報告されていることから、甲状腺ホルモンが $\alpha 2M$ 濃度に影響している可能性を考えた。ところが、TSH や free T4 値と $\alpha 2M$ 値に関連はみられなかった。TSH、free T4 は一時点での甲状腺機能であり、長期の甲状腺ホルモンの体内動態や総量をあらわしているものではないため、関連がみられなかった可能性がある。一定の期間、甲状腺ホルモンが高値である場合や、長期にレボチロキシンを内服していることが、 $\alpha 2M$ の合成を誘導し、 $\alpha 2M$ の総量を増加させている可能性は捨てきれない。総 T3、T4 との関連の検討や長期に甲状腺機能との関連をみる前向き研究の必要性が示唆される。

糖尿病群においては、これまで血糖や HbA1c と $\alpha 2M$ 値が相関するという報告が多くみられたが、今回の測定系での検討では、糖尿病群の HbA1c と $\alpha 2M$ 値は相関しなかった。CGM を使用した症例では、 $\alpha 2M$ は CGM の平均血糖や血糖変動の指数(SD, J-index, M 値, CV)とも相関はみられなかった。 $\alpha 2M$ は炎症時に上昇する急性期タンパク質であり、動脈硬化や虚血性心疾患では上昇していることが知られる。今回の単回帰分析では $\alpha 2M$ 値は baPWV と maxIMT とに相関し、

運動負荷試験の陽性例と冠動脈狭窄所見のある群で高値であったことに加え、重回帰分析でも $\alpha 2M$ 値には baPWV が有意に影響していることから、 $\alpha 2M$ が動脈硬化のマーカーとなりうることが示唆された。

尿中アルブミンは心血管疾患のリスク因子であるが、そのメカニズムはこれまで明らかでなかった。またネフローゼ症候群では肝での $\alpha 2M$ 合成が増加することが知られているが、微量アルブミン尿と $\alpha 2M$ との関係についての詳細な検討は少ない。今回の結果から、ネフローゼ症候群以前の微量 Alb 尿がみられる段階から、 $\alpha 2M$ は上昇していることが示唆された。 $\alpha 2M$ が尿中アルブミンの程度と動脈硬化の程度に有意に関連していることは、 $\alpha 2M$ が動脈硬化のマーカーになっていると同時に、それ自体が動脈硬化の原因となり、心血管疾患を引き起こしている可能性も考えられた。

以上から、 $\alpha 2M$ 値の決定に最も影響しているのは尿中アルブミン、動脈硬化の程度であり、これまで $\alpha 2M$ が血糖や HbA1c と相関するという報告の結果は、血糖や HbA1c そのものではなく、それらから引き起こされる合併症の程度との相関をみていた可能性がある。また、 $\alpha 2M$ は心血管疾患の直接の原因となっている可能性も示唆される。